پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۵، صفحات ۲۴۵ تا ۲۵۲

مقاله اصلی
(Original Article)

استرپتوکیناز: استخراج ،کلون‌سازی و بیان بالای پروتئین نوترکیب فعال با رویکرد تسهیل در فرآیند خالص‌سازی

محمدرضا نژاد مقدم*، دکتر سیدمحمدحسین مدرسی، دکتر محمد باباشمسی***، دکتر محمود چمن‌خواه*****

* مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران
** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران
*** مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران

چکیده

سابقه و هدف: *استرپتوکیناز به عنوان شناخته‌شده‌ترین داروی فیبرینولیتیک، مدت مدیدی است در درمان سکته قلبی استفاده می‌شود. ویژگیهای ساختاری ساده این پروتئین زمینه لازم برای دستیابی به انواع نوترکیب آن را فراهم ساخته است. هدف از این تحقیق تهیه سوش استرپتوکوک equisimilis H46A (پربازده از نظر تولید استرپتوکیناز) برای اولین بار در ایران بود تا پس از استخراج DNA، ژن استرپتوکیناز بگونه‌ای تکثیر شود که امکان کلون‌سازی آن در حاملهای متعدد بوجود آید.*

روش بررسی: *پس از استخراج DNA ژنومی ژن استرپتوکیناز از دو ناحیه با استفاده از دو پرایمر بالادست و یک پرایمر پایین‌دست ضمن در نظر گرفتن یک جایگاه آنزیم برش‌دهنده معمول برای دو سر محصولات (کل ORF، bp ۱۳۲۳ و قسمت مربوط به پروتئین بالغ، bp ۱۲۴۵) تکثیر شد و در حامل pGEX-4T-2 تحت پروموتور قوی tac و قابلیت بیان بالا کلون شد. پلاسمید نوترکیب حاصل بوسیله عملیات هضم دو طرفه و تعیین توالی، تأیید و در اشریشیاکلی سویه BL21(DE3)plysS' ترانسفورم شد. میزان بیان و فعالیت استرپتوکیناز نوترکیب مربوط به کلون واجد قطعه ۱۲۴۵bp با استفاده از دانسیتومتر لیزری و تست اختصاصی با سوبسترای S2251 در مقایسه با یک نمونه استرپتوکیناز خارجی مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *استفاده از یک آنزیم برش‌دهنده برای دو سر قطعه ژن، کلون‌شدن آن‌را در تعداد زیادی از حاملهای بیانی امکان‌پذیر ساخت. میزان بیان پروتئین نوترکیب به بیش از ۴۵٪ کل پروتئینهای میزبان، موفقیت در کلون‌سازی را تأیید کرد. وجود دم اتصالی گلوتاتیون S ترانسفراز(GST) مانع فعالیت استرپتوکیناز نشد و مقدار آن بدون بهینه‌سازی و تخلیص شرایط کشت بیش از ۱۵۰۰۰u/ml از کشت ثبت شد.*

نتیجه‌گیری: *استفاده از حامل pGEX-4T-2 ضمن تولید استرپتوکیناز نوترکیب فعال و با بازدهی فراوان، دم GST را نیز به ابتدای آمینی آن اضافه می‌کند که می‌توان از آن برای تخلیص یک مرحله‌ای و آسان با استفاده از لیگاند گلوتاتیون سود برد.*

واژگان کلیدی: *pGEX-4T-2، استرپتوکیناز، کلون‌سازی، پروتئین نوترکیب، تخلیص.*

مقدمه

ژن استرپتوکیناز (*skc*) سوش S.equisimilis H46A بوسیله Malke و همکارانش در سال ۱۹۸۵ تعیین توالی شد (۱). در سال ۱۹۹۵نحوه کنترل نسخه‌برداری این ژن مورد مطالعه قرار گرفت (۲) و در سال ۱۹۹۶ فعالیت کمپلکس پروموتوری آن آنالیز شد (۳). این ژن سه نوع پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای با وزنهای ۳۰، ۴۵ و ۴۷ کیلودالتون را بیان می‌کند. نوع ۴۷ کیلودالتون آن در فعال‌سازی پلاسمینوژن بیشترین نقش را دارد و همیشه مورد هدف بوده است. این پروتئین بیش از ۴۱۴ اسید آمینه دارد (۵،۴) و حداکثر فعالیت آن در

آدرس نویسنده مسئول: تهران، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، دکتر محمد باباشمسی (**email:** babashams@avesina.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸٤/۸/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۵/۲۸

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

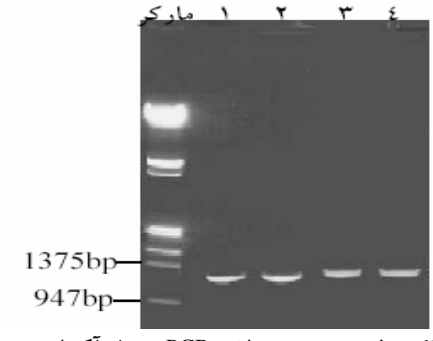
PH حدود ۷/۵ است همچنین PH ایزوالکتریک آن ۴/۷ می‌باشد (۶). این پروتئین Cystine، Cysteine، فسفر، کربوهیدرات‌های کونژوگه و چربی ندارد و قسمت N ترمینال آن همواره بدون تاخوردگی است (۷) البته استرپتوکیناز تولیدی درگروههای استرپتوکوکی مختلف ساختار بسیار متفاوتی دارد (۸). مدت مدیدی است که این پروتئین به عنوان شناخته شده‌ترین داروی فیبرینولیتیک بر علیه بیماریهای ناشی از ایجاد لخته‌های خونی پرآکنده در سیستم گردش خون و سکته‌های قلبی استفاده می‌شود (۹). جدیدترین تحقیقات درباره ساختار استرپتوکیناز نشان می‌دهد ناحیه Asp41-His48 استرپتوکیناز در اتصال به پلاسمینوژن، ناحیه C-terminal در شناسایی و فعال‌سازی پلاسمینوژن و ناحیه مربوط به اسیدآمینه‌های ۵۹-۴۸ در فعال‌سازی پلاسمینوژن نقش دارد (۴). استرپتوکیناز توانایی فعال‌سازی پلاسمینوژن آزاد در خون و هم پلاسمینوژن متصل به فیبرین را دارا است. مطالعات مقایسه‌ای نشان می‌دهند که استرپتوکیناز نه تنها نسبت به سایر داروهای ترمبولیتیک مثل یوروکیناز(Urokinase) و فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی(t-PA) امتیاز کمتری ندارد، بلکه پایین بودن هزینه تولید این دارو، آن را از سایر انواع متمایز کرده است(۴،۱۰،۱۱). ویژگیهای ساختاری ساده در این مولکول از جمله وجود نواحی عملکردی مستقل از هم، نداشتن اتصالات دی سولفید و گروههای پروستتیک و مناطق اتصال به کاتیون‌های دو ظرفیتی، بطور کلی نداشتن ساختمان فضائی سوم، زمینه لازم برای دستیابی به انواع نوترکیب استرپتوکیناز را فراهم می‌سازد. تاکنون در مطالعات کلون‌سازی ژن استرپتوکیناز از حاملهای بیانی چون باکتریوفاژλL47 (۱۲)، حاملهای خانواده pBR322 یا pMF5، pSK100(۱۳)،pKK223-3(۱۴)،pQE-30(۱۵)،pEKG-3 (۱۶) و pHT(۱۷)، همچنین میزبانهای باسیلوس سوبتیلیس (B. subtilis WB600)(۱۸)، استرپتوکوکوس سنگوئیس(۵)، اشریشیاکلی(۱۶-۱۲) و مخمر(۱۷،۱۰) استفاده شده است. براساس تجربیات قبلی در تولید استرپتوکیناز غیرنوترکیب(۱۹)، تولید اندک سم تبزا در استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک گروه C و همچنین موفقیتهای حاصل در تولید این پروتئین نوترکیب از میزبان E.coli(۴)، ما برای استخراج ژن استرپتوکیناز از سوش S.equisimilisH46A و از E.coli بعنوان میزبان کلون‌سازی و همچنین از حامل جدیدی با ویژگی تسهیل در عملیات تخلیص استرپتوکیناز نوترکیب اتصالی استفاده کردیم.

مواد و روشها

سوش S.equisimilisH46A ATCC 12449 از بانک میکروبی آمریکا، سوش‌های مهندسی شده DH5α و BL21(DE3) و همچنین پرایمرها و آنزیمهای محدودکننده (BamHI، HindIII و EcoRI) از شرکت سیناژن ایران، کیت PCR، آنزیم آلکالین فسفاتاز، لیزوزیم، RNaseA و سایز مارکر از شرکت Roche آلمان، IPTG از شرکت Fermentase آلمان، سوبسترای S2251 از شرکت Chromogenix آلمان و تمامی نمکهای مورد استفاده از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. تعیین توالی محصول PCR ونتیجه کلون‌سازی در مرکز ملی‌تحقیقات‌کانادا (National Research Council,Canada:NRC) و بررسی نقشه آنزیمی(Restriction enzymes) ژن استرپتوکیناز در سایت Webcutter 2.0 انجام شد.

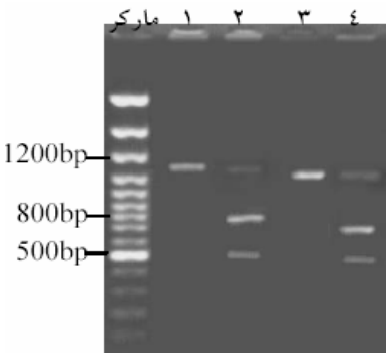
استخراج DNA ژنومی از سوش S.equisimilisH46A با روش لیز سلولها (۲۰) و اصلاحات انجام شده توسط Gase و همکارانش انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR): با دو پرایمربالادست STK1:5′GCTGGATCCATGAAAAATTACTTATCTTTTGG3′ از ناحیه کدون شروع (برای تکثیر قطعه ۱۳۲۳ جفت باز) و 4SKf:5′ CGCGGATCCATTGCTGGACCTGAG3′، از ناحیه مربوط به استرپتوکیناز بالغ (برای تکثیر قطعه ۱۲۴۵ جفت باز) و تک پرایمر پایین‌دست STK-2:5′GCTGGATCCTTATTTGTCGTTAGGGTTATC3′ انجام شد. مقادیر مورد استفاده در واکنش شامل: ۲/۵ میکرولیتر 10XPCR buffer، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCL_2$، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام dNTp، ۰/۶ میکرومولار از هر دو پرایمر، ۱ واحد آنزیم و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. از برنامه ۳۰ ثانیه در ۹۴ºC، ۳۰ ثانیه در ۵۰ºC و ۴۵ ثانیه در ۷۲ºC طی ۲۹ دور استفاده شد (۱). محصولات PCR با استفاده از سایز مارکر و عملیات هضم با آنزیم HindIII ارزیابی و تأیید شدند (۲۱)(شکل۱ و۲).



شکل۱- الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز: ستونهای۱و۲ محصولات 1245bp و ستونهای۳و۴ محصولات 1323bp

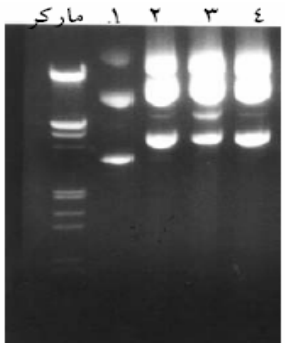
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]



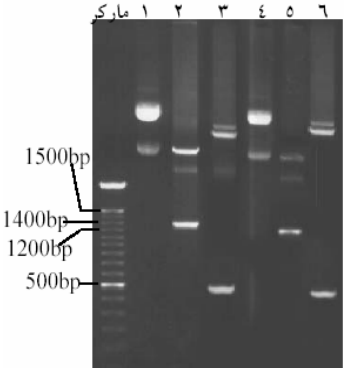
شکل۲- تأیید محصولات PCR توسط هضم با آنزیم HindIII: ستون ۱ و ۳ به ترتیب محصول 1323bp و 1245bp و ستونهای ۲ و ۴ نتیجه هضم این محصول توسط آنزیم HindIII را نشان می دهد

تکثیر حامل: حامل pGEX-4T-2 پس از ترانسفورم کردن (۲۱) در DH5α مستعد (Competent) با استفاده از روش لیز قلیایی (۲۰) و دو اصلاح ذیل تکثیرشد: ۳ میلی‌لیتر کشت شبانه (overnight) را پس از سانتریفیوژ و دور ریختن ۱/۵ میلی‌لیتر مایع رویی به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر رساندیم (به‌منظور امکان‌پذیری آزمایش در میکروتیوب). همچنین پس از اضافه کردن بافر لیزکننده I به آن، ۱۰میکرولیتر آنزیم RNaseA (1mg/ml) اضافه کردیم (با هدف حذف RNA و همچنین حذف خودبخودی آنزیم در حین اضافه کردن محلولهای بعدی) (۲۱).

کلون‌سازی. هضم حامل و محصول PCR با تک آنزیم BamH I انجام شد. برای بالا بردن کارایی کلون‌سازی و جلوگیری از خود اتصالی حامل، برداشتن فسفات از انتهای ´۵ آن با استفاده از آلکالین فسفاتاز(CIP) انجام شد (۲۰،۲۱). تمام مراحل خالص‌سازی قطعه ژن (insert) و حامل به روش الکتروفورز و استخراج از ژل آگاروز انجام گردید. در نهایت قطعه مورد نظر با فرآیند Ligation در حامل pGEX-4T-2 کلون شد. پس از ترانسفرم این مخلوط اتصالی(Ligation mix) در سلول DH5α و کشت آن روی محیط L.B آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، کلنی‌های رشدیافته به‌عنوان کلون‌های واجد حامل و احتمالاً واجد قطعه ژن انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در حامل، این کلنی‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب و پس از انجام عمل استخراج پلاسمید، توسط الکتروفورز ژل آگاروز بررسی شدند (شکل۳). تأیید قرارگیری صحیح قطعه ژنی با توجه به نقشه تئوریک حامل واجد قطعه ژنی، به‌وسیله آزمایش هضم، یک‌بار با آنزیمBamHI (که بایستی قطعه دخولی را از پلاسمید جدا کند) و بار دوم با آنزیم HindIII و EcoRI (بایستی توالی نوکلئوتیدی حدود502bp را ایجاد کند) انجام شد (شکل۴). در نهایت با عمل تعیین توالی که توسط مرکز تحقیقات ملی کانادا (NRC) انجام شد، صحت کامل توالی ژن استرپتوکیناز کلون شده و قرارگیری صحیح آن در جایگاه خواندن (Reading frame) مورد تایید قرار گرفت (۲۱). پس از تأیید کلون‌سازی، حامل pGEX-4T-2 واجد قطعه 1323bp و 1245bp از ژن استرپتوکیناز به ترتیب pGEX-1.3-4T-2 و pGEX-1.2-4T-2 لقب گرفتند. آنگاه حامل pGEX-1.2-4T-2 در میزبانهای BL21 (DE3)22 با ژنوتیپ BF- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal Lambda(DE3)، BL21(DE3)plysS' با ژنوتیپ BF- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal Lambda(DE3)[plysS Camr] و BL21(DE3)codon plus با ژنوتیپ BF- dcm+ ompT hsdS (rB- mB-)TetR gal (DE3) endA Hte[argU proL CamR]extra copies of tRNA genes inBL21- codon plus-RP ترانسفورم شد.



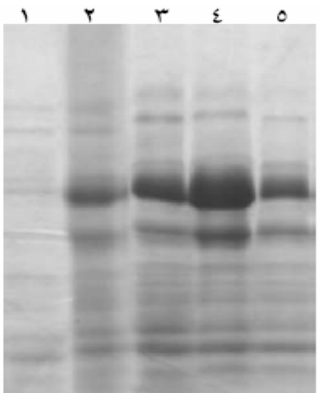
شکل۳- غربالگری کلنی‌های رشدیافته در محیط LB آگار واجد آمپی سیلین بعد از ترانسفورماسیون مخلوط اتصالی (pGEX-4T-2 + insert): **ستون ۱ حامل** pGEX-4T-2 **(بدون قطعه ژنی) و ستون های ۲، ۳ و ۴** pGEX-4T-2 **واجد قطعه ژنی(احتمالاً** pGEX-1.2-4T-2 **و** pGEX-1.3-4T-2).



شکل۴- تأیید حضور و صحت قرارگیری قطعه ژن توسط آزمایش هضم دوطرفه: ستون ۱و۴ واجد حامل pGEX-1.2-4T-2 **و** pGEX-1.3-4T-2 **؛ در صورت قرارگیری صحیح قطعات** 1323bp **و** 1245bp **درون پلاسمید** pGEX-4T-2 **محصول آزمایش برش با آنزیم** BamHI **خروج قطعه ژنی** 1323bp **و** 1245bp **خواهد بود(ستون ۲ و ۵) و نتیجه هضم با آنزیم‌های** HindIII **و** EcoRI **یک قطعه** 502bp **خواهد بود (ستون ۳و۶).**

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب با این روش ساده انجام شد: ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری BL21(DE3) واجد پلاسمید نوترکیب را در ۵ میلی‌لیتر محیط LB جدید (حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین) کشت دادیم و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ºC و هوادهی با دور ۲۵۰rpm جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰nm به حدود ۰/۶ رسید، در این زمان ۰/۱میلی‌مولار IPTG اضافه کردیم تا عمل القاء صورت گیرد، سپس در زمانهای ۱، ۲ و ۴ ساعت هر بار ۱ میلی‌لیتر از کشت را برداشته وارد میکروتیوب‌های جداگانه کردیم. آنگاه این میکروتیوب‌ها با دور ۸۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر از 1X-SDS-PAGE Sample buffer اضافه کرده ۵ دقیقه شدیداً ورتکس شدند، سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و بعد از سانتریفیوژ با دور بالا از مایع رویی آنها برای انجام الکتروفورز(SDS-PAGE) و بررسی وضعیت بیان پروتئین در ساعات ذکر شده استفاده شد (۲۱) (شکل۵).



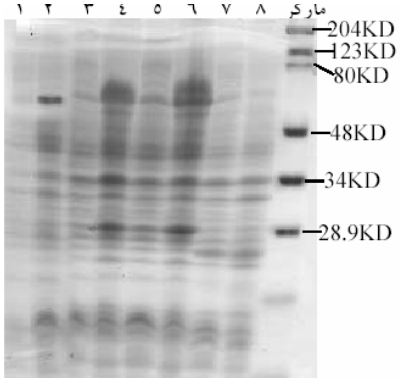
شکل ۵- القاء کلون واجد pGEX-1.2-4T-2: ستون ۱ کلون واجد pGEX-4T-2 (کنترل منفی). ستونهای ۲ تا ۵ BL21(DE3) واجد pGEX-1.2-4T-2 به ترتیب بعد از القاء با IPTG در زمانهای ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت

آزمایش فوق برای دو سویه میزبانی BL21(DE3)plysS´ و BL21(DE3)codonplus نیز جهت مقایسه میزان بیان پروتئین نوترکیب انجام شد (شکل۶).

تعیین فعالیت پروتئین نوترکیب: از ۳ میلی‌لیتر کشت BL21(DE3)plysS´ پس از ۴ ساعت القاء با IPTG، به روش ذیل لیز سلولی تهیه شد:

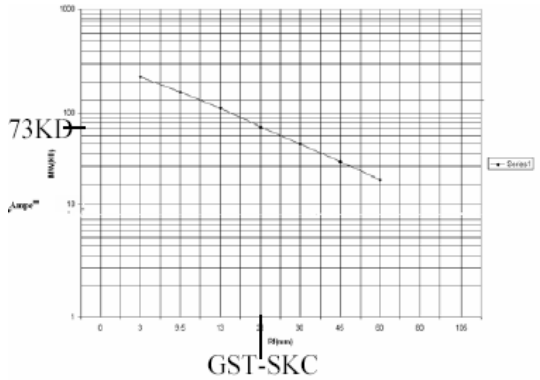
پس از سانتریفیوژ محیط کشت به رسوب حاصل ۱میلی‌لیتر بافرلیزکننده (pH=8 Tris.Cl ۵۰mM، EDTA ۱mM، NaCl ۱۰۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر PMF(0.2M) و ۱۰/۴ میکرولیتر Lysozyme(10mg/ml) اضافه شد. پس از۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ºC دیواره باکتریهای این مخلوط توسط هموژنایزر، با دور ۲۲۰۰۰rpm به‌مدت ۴ دقیقه تخریب شد، آنگاه با انجام میکروفیوژ در دور بالا محلول شفافی بدست آمد (۲۰،۲۱). این محلول شفاف از رسوب جدا شد و به این ترتیب برای آزمایش ارزیابی فعالیت پروتئین مورد استفاده قرار گرفت: در میکروپلیت‌الایزا به ۱۵میکرولیترازمحلول شفاف‌شده ۱/۵ میکرولیتر Tris.HCl PH=7.4 و ۳۰ میکرولیتر plasminogen (0.2mg/ml) (تهیه شده در این آزمایشگاه) اضافه کرده، ۱۵ دقیقه در ۳۷ºC انکوبه کردیم. پس از این زمان به آن ۷۵ میکرولیتر سوبسترای کروموژنیک S2251(5mg/ml) اضافه کرده و بعد از۱۰ دقیقه نگهداری در۳۷ºC واکنش را توسط ۱۰ میکرولیتر اسید استیک ۴ نرمال متوقف کردیم. در این زمان جذب نوری واکنش در طول موج ۴۰۵ نانومتر با الایزا ریدر در مقایسه با استرپتوکیناز استاندارد قرائت شد و همچنین احتمال ترشح پروتئین نوترکیب بصورت خارج سلولی، با نمونه‌برداری ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و به روش ذکر شده فوق مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تعیین دقیق وزن مولکولی باند منسوب به پروتئین نوترکیب(GST-SKC) در SDS-PAGE بدین صورت عمل شد: به کمک خط‌کش فاصله طی شده از چاهک (Rf) برای شش باند پروتئینی مارکر به دست آمد. با توجه به رابطه معکوس بین Rf و وزن مولکولی پروتئین، منحنی مربوط به صورت نیمه لگاریتمی رسم شد. پس از رسم منحنی مربوطه با مشخص کردن Rf مربوط به باند منسوب به GST-SKC بر روی محور افقی نقطه معادل آن بر محور عمودی (وزن مولکولی) پیدا شد (شکل ۷).



شکل۶- ترانسفورم میزبانهای اشریشیاکلی DH5α، BL21(DE3)، BL21(DE3)plysS´ و BL21(DE3)Codonplus با ساختار تأیید شده پلاسمید نوترکیب pGEX-1.2-4T-2 و مقایسه Productivity در این سه میزبان: ستونهای ۱ و۲، ۳ و۴، ۵ و۶، ۷ و ۸ به ترتیب قبل و بعد از القاء سویه‌هایDH5α، BL21(DE3)، BL21(DE3)plysS´ و BL21(DE3)Codonplus می‌باشند

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]



شکل ۷- تعیین دقیق وزن مولکولی باند منسوب به پروتئین نوترکیب (GST-SKC) درSDS-PAGE: محور عمودی نمایانگر وزن مولکولی پروتئین با تقسیمات لگاریتمی و محور افقی نمایانگر فاصله طی شده از چاهک با تقسیمات میلی‌متر می‌باشد. RF **باند مربوط به سایز مارکرهای ۲۰۴، ۱۲۳، ۸۰، ۴۸، ۳۴ و ۲۸/۹ کیلودالتون به ترتیب ۳، ۹/۵، ۱۳، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی متر بود. بر این اساس** RF **باند منسوب به** GST-SKC **حدود ۲۳ میلیمتر بوده که مختصات آن بر محور وزن مولکولی(**MW**) نقطه حدود ۷۳ کیلودالتون را نشان می دهد**

یافته‌ها

شرایط بهینه (غلظتهای مختلف یون منیزیم و بافر،dNTP، پرایمر، آنزیم پلی‌مراز، DNA الگو و درجه حرارتهای مختلف) برای جداسازی و تکثیر ژن استرپتوکیناز از ژنوم S.equisimilis H46A با استفاده از تکنیک PCR کنترل شد و روش عملی استانداردی با پرایمرهای طراحی شده به دست آمد. طی عملیات کلون‌سازی نیز لزوم بعضی اصلاحات در روشهای موجود برای کسب نتایج مطلوب لمس شد. الکتروفورز محصولات PCR و آزمایش با آنزیم *Hin*dIII که طبق نقشه، محصولات را به دو قطعه بزرگتر (747bp 1245bp و 825bp برای محصول 1323bp) و قطعه کوچکتر(498bp) برش می‌دهد، حاکی از موفقیت در جداسازی و تکثیر ژن استرپتوکیناز (قطعه1245bp مربوط به ناحیه فعال و قطعه 1323bp باز مربوط به ORF کامل ژن) بود (شکلهای۱ و ۲).

نتایج آزمایشهای استخراج پلاسمید و الکتروفورز (شکل۳)، هضم دو طرفه (شکل۴) و تعیین توالی، موفقیت انجام کلون‌سازی قطعات 1323bp و1245bp از ژن استرپتوکیناز را در حامل pGEX-4T-2 تأیید می‌نمایند. با محاسبه تئوریک وزن خالص استرپتوکیناز (۴۷ کیلودالتون) به‌علاوه وزن خالص GST (۲۳ کیلودالتون) و همچنین وزن مولکولی اسید آمینه‌های دیگری که در قالب ترجمه پروتئین تا قبل از رسیدن به کدون ختم احتمالاً ترجمه می‌شوند، وزن پروتئین نوترکیب GST-SKC حدود ۷۳ کیلودالتون پیش‌بینی شد که این با منحنی نیمه‌لگاریتمی بر اساس RF و وزن مولکولی پروتئین مطابقت دارد (شکل ۷).

بیان استرپتوکیناز نوترکیب اتصالی بوسیله SDS PAGE (شکل۶) و همچنین دانسیتومتر لیزری، بیش از ۴۵٪ کل پروتئینهای سلول میزبان ارزیابی شد. این میزان در سویه $BL_{21}(DE_3)$codon plus کمترین و در سویه $BL_{21}(DE_3)$pLysS' حداکثر می‌باشد (شکل۶). مهمتر اینکه دم اتصالی مربوط به‌GST تاثیری در غیر فعال کردن استرپتوکیناز نداشت، بطوری‌که بدون بهینه‌سازی شرایط کشت و تخلیص، مجموع فعالیت حاصل از ۱ میلی‌لیتر کشت بیش از ۱۵۰۰۰ واحد محاسبه شد. ضمن اینکه در ارزیابی احتمال ترشح این پروتئین نوترکیب در محیط کشت مشاهده شد که۲۰٪ از پروتئین نوترکیب بصورت خارج سلولی ترشح می‌شود.

بحث

از استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک گروه C که کمترین میزان توکسین‌های تب‌زا را تولید می‌کنند و کمترین مواد غذایی را نسبت به سوش‌های اصلی گروه A مصرف می‌کنند، به‌عنوان منبع اصلی ژن استرپتوکیناز یاد می‌شود (۴). به همین دلیل، در این تحقیق، ژن استرپتوکیناز از این سوش استخراج گردید و برای مراحل کلون‌سازی استفاده شد.

گزارش شده است قسمت N ترمینال مولکول استرپتوکیناز تاثیر چندانی بر فعالیت آن ندارد (۷). بنابراین احتمال داده شد که اضافه شدن توالی اسیدآمینه‌ای مربوط به GST به N ترمینال این پروتئین فعالیت بیولوژیکی آن را از بین نبرد، همچنان‌که افزایش ۶ اسیدآمینه هیستیدینی (۱۵) و نیز دم اتصالی MBP (۲۲) این مطلب را تأیید می‌کرد. این ویژگی اساس تحقیق ما را در انتخاب حامل pGEX-4T-2 تشکیل می‌دهد.

وجود ۲۶ اسید آمینه هیدروفوب بعنوان توالی راهنما در انتهای آمینی مولکول استرپتوکیناز امکان ترشح آن را توسط استرپتوکوک‌ها فراهم می‌آورد (۱۰) اما بر اساس گزارشات موجود ترشح استرپتوکیناز نوترکیب (r-SK) بیان شده در E.coli حتی در غیاب توالی راهنما نیز می‌تواند صورت گیرد (۱۴). بر همین اساس ژن *skc* از ناحیه بعد از توالی راهنما بطول ۱۲۴۵ جفت باز نیز تکثیر شد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

برخلاف مطالعات مشابه (۲، ۱۷-۱۱) برای اولین بار طراحی پرایمر و استراتژی PCR ، با هدف تعبیه سایت شناسائی *Bam*HI در دو انتهای توالی ژنی تکثیر شده انجام گرفت. این استراتژی، کلون‌سازی محصولات PCR (ژن*skc*) را در حاملهای بیانی متعدد امکان‌پذیر می‌سازد و سبب می‌شود قطعه ژن درست بعد از توالی پروتئینی GST قرار گیرد. با توجه به اینکه آخرین کدون در سمت '۳ ژن *skc* توالی ختم ترجمه (TAA) می‌باشد، انتظار می‌رود که اسیدآمینه اضافی دیگری در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار نگیرد. ولی در صورتی که به هر دلیل این کدون ختم عمل نکند، کدون ختم موجود در حامل (TGA) که بعد از ناحیه MCS قرار گرفته است موجب ختم ترجمه خواهد شد. در این صورت تعداد ۱۲ اسیدآمینه دیگر به انتهای کربوکسیل پروتئین افزوده خواهد شد. به این ترتیب با دانستن وزن مولکولی اسید آمینه‌های اضافه شده به مولکول و جمع آنها با وزن مولکولی پروتئین SKC (۴۷ کیلو دالتون)، می‌توان وزن مولکولی پروتئین نوترکیب (GST-SK) را حداقل۷۳ و حداکثر۷۴ کیلو دالتون پیش‌بینی کرد. در روش غربالگری برخلاف روش شناسایی کلون‌های صحیح به روش α-complementation (۲۰،۱۷)، مستقیماً از این ویژگی که باکتری‌های دریافت‌کننده ساختار pGEX-4T-2 به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم خواهند شد، استفاده گردید، این امر سبب صرفه جویی در زمان می‌شود.

در مطالعات گذشته بیان پروتئین r-SK در باکتری E.coli تحت اثر پروموتورهای مختلف به میزان ۵۲٪ (۱۲) و ۲۵٪ (۱۶) از کل پروتئینهای سلول گزارش شده است. در این تحقیق نیز با استفاده از حامل pGEX-4T-2 و پروموتور *tac* میزان بیان پروتئین نوترکیب بدون بهینه‌سازی شرایط به حدود ۴۵٪ از کل پروتئینهای باکتری رسید. بطوری‌که میزان فعالیت آن بیش از ۱۵۰۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مقایسه با مطالعات مشابه (۲۳) و استرپتوکیناز استاندارد مطلوب می‌باشد. ضمناً آزمایش بیان در محیط مایع LB انجام گرفت در حالی‌که با غنی کردن محیط کشت و در نتیجه تقویت روندهای متابولیکی باکتری، افزایش میزان پروتئین نوترکیب حتمی خواهد بود (۴). در این مطالعه حضور IPTG به میزان ۰/۱ میلی‌مولار باعث روشن شدن اپرون و شروع سنتز mRNA شد. این در حالی است که در موارد دیگر برای بیان پروتئینهای نوترکیب غلظتهای بیشتری از IPTG بعنوان غلظت مناسب معرفی شده‌اند (۲۴،۲۵).

میزبانهای بیانی با داشتن عناصر تنظیمی مناسب و یا موتاسیون در پروتئازهای خود امکان بیان بیشتر پروتئین را فرآهم می‌آورند. در تحقیق حاضر از چند گونه میزبان E.coli که از مشتقات $BL_{21}(DE_3)$ می‌باشند به منظور مقایسه بیان پروتئین نوترکیب استفاده کردیم. همانطور که در شکل۶ مشاهده می‌شود، میزان بیان استرپتوکیناز نوترکیب (GST-SKC) در این سه گونه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد بطوری‌که میزان بیان درسویه $BL_{21}(DE_3)$codon plus کمترین و در سویه '$BL_{21}(DE_3)$pLysS حداکثر می‌باشد. بنابراین دلیل بیان بیشتر در سویه '$BL_{21}(DE_3)$pLysS به وجود موتاسیون‌های پروتئازی به نفع استرپتوکیناز بر می‌گردد.

با وجود امکان تولید پروتئین نوترکیب از حاملها و میزبانهای گوناگون، هنوز هم تخلیص پروتئین‌های نوترکیب بعنوان یک مسئله مهم مطرح است. به همین دلیل مطالعات زیادی در زمینه تخلیص استرپتوکیناز صورت گرفته است. به نظر می‌رسد پیشتازترین روش، استفاده از لیگاند پلاسمینوژن باشد که در بیشتر مطالعات قبلی مورد استفاده بوده است (۴،۲۶،۲۷). این روش مستلزم مراحل متعدد استفاده از ستون تعویض یونی، دو مرحله رسوب‌گیری، کاهش حجم نمونه، تهیه ستون پلاسمینوژن-سفارز4B و آسیلاسیون پلاسمینوژن و استفاده از بافرهای متعدد است. اما کلون نمودن ژن استرپتوکیناز در حامل pGEX-4T-2، استرپتوکیناز نوترکیبی واجد دنباله اتصالی گلوتاتیون اس ترانسفراز را حاصل می‌آورد که می‌توان آن‌را بوسیله ستون کروماتوگرافی تمایلی با لیگاند گلوتاتیون تخلیص کرد (۲۰،۲۴). در این روش می‌توان از امتیازات یک مرحله‌ای شدن عمل تخلیص، کاهش میزان واسرشتگی، عدم تغییر pH فیزیولوژیکی پروتئین، عدم اضافه کردن خاصیت آنتی‌ژنیک جدید و کاهش تعداد بافرها و محلولهای مرحله تخلیص سود برد. پروتئین ترومبین قادر به شناسایی جایگاه اسیدآمینه‌ای بین SKC و GST می‌باشد و در صورت نیاز می‌توان با استفاده از این جایگاه دنباله GST را از SKC جدا کرد (۲۴).

تولید استرپتوکیناز نوترکیب با بازدهی فراوان و قابلیت تخلیص آسان در مقیاس صنعتی، می‌تواند گامی موثر در جهت تولید ماده اولیه این داروی ژنریک در کشور باشد که سالانه بیش از یک میلیون دلار هزینه صرف خرید ۵۰ هزار آمپول مصرفی آن می‌شود (۲۸). از فوائد دیگر قابل دسترس بودن کلون حاصل، امکان مطالعات دیگر همچون استفاده از دیگر حاملها، سلولهای بیانی، جهش‌زایی، کاهش ایمونوژنیسیته و بهینه‌سازی شرایط تولید (فاکتورهای موثر بر بیان پروتئین مانند دما، نوع محیط کشت، غلظت القاءکننده، انواع القاء

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

کننده، زمان القاء، مدت زمان القاء و پیدا کردن فاز لگاریتمی رشد باکتری در هنگام القاء) است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از دو پروژه تحقیقاتی سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور مصوب شورای پژوهشهای علمی کشور و معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی می‌باشد. بدین وسیله از سازمانهای یاد شده بخاطر حمایت مالی و همچنین آقای مهدی ملکی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بخاطر همکاری در قسمت ارزیابی فعالیت پروتئین نوترکیب قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Nejadmoqaddam MR, Modaresi MH, editors. Topic parameters for PCR optimization. 1st edition. Acecr publication, 2005.
2. Gase K, Ellinger T, Malke H. Complex transcriptional control of the streptokinase gene of streptococcus equisimilis H46A. Mol Gen Genet 1995;247(6):749–58.
3. Gase K, Gase A, Schirmer H, Malke H. Cloning, sequencing and functional overexpression of the streptococcus equisimilisH46A gapC gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. Eur J Biochem 1996;239(1):42-51.
4. Banerjee A, Yusuf Chisti UC. Streptokinase; a clinically useful thrombolytic agent. Biotech Adv 2004;22:287–307.
5. Malke H, Gerlach D, Kohler W, Ferretti JJ. Expression of a streptokinase gene from Streptococcus equisimilis in Streptococcus sanguis. Mol Gen Genet 1984;196(2):360–3.
6. De Renzo EC, Siiteri PK, Hutchings BL, Bell PH. Preparation and certain properties of highly purified streptokinase. J Biol Chem 1967;242(3):533–42.
7. Tueten AG, Broadhurst RW, Smith AGR, Dobson MC. Characterization of structural and folding properties of streptokinase by N.M.R. spectroscopy. Biochem J 1993;290:313-19.
8. Huang T, Malke H, Ferretti J. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A streptococci. Infect Immun 1989;57(2):502-6.
9. Karen GRN, Gold M. Acute coronary syndromes: New developments in pharmacological treatment strategies. Crit Care Nurse 2000;20:2.
10. Campbell T, editor. Thrombolysis following acute myocardial infarction. An initiative of NSW Clinical Pharmacologists & Pharmacists Funded by the NSW Department of Health. 2nd edition. 1999.
11. Kumar R, Singh J. Expression and secretion of a prokaryotic streptokinase without glycosilation and degradation. Schizosaccharomyces Pombe Wiley InterScience 2004;21(16):1343-58.
12. Malke H, Ferretti JJ. Streptokinase: cloning, expression and excretion by Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 1985;81:3557–61.
13. Ko JH, Park DK, Kim IC, Lee SH, Byun SM. High-level expression and secretion of streptokinase in Escherichia coli. Biotech Lett 1995;17:1019-24.
14. Avilan L, Yarzabal A, Jurgensen C, Bastidas M, Cruz J, Puig J. Cloning, expression and purification of recombinant streptokinase: partial characterization of the protein expressed in Escherichia coli. Bra J Med Biol Res 1997;30(12):1427–30.
15. Caballero AR, Lottenberg R, Johnston KH. Cloning, expression, sequence analysis, and characterization of streptokinases by porcine and Equine Isolates of Streptococcus equisimilis. Infect Immun 1999;67(12):6478-86.
16. Estrada MP, Hernandez L, Perez A, Rodriguez P, Fuente de la, Herrera L. High-level expression of streptokinase in E.coli. Biotechnology 1992;10:1138-42.
17. Hagenson MJ, Holden KA, Parker KA, Wood PJ, Stroman DW. Expression of streptokinase in Pichia pastoris yeast. Enzyme Microb Tech 1989;11:650-56.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

18. Wu XC, Ye RQ, Duan YJ, Wong SL. Engineering of plasmin-resistant forms of streptokinase and their production in Bacillus subtilis: streptokinase with longer functional half-life. Appl Environ Microbiol 1998;64(3): 824–9.

۱۹. رضویان س م ح. استخراج و تخلیص استرپتوکیناز از استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک گروه C. پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، سال ۱۳۸۲.

20. Sambrook J, Russell D, editors. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd edition. CSHL press, 2001.

۲۱. نژادمقدم م ر. استخراج ،کلون‌سازی و بیان ژن استرپتوکیناز با استفاده از streptococcus equisimilis H46A. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم.

22. Sazonova IY, Houng AK, Chowdhry SA, Robinson BR, Hedstrom L, Reed GL. The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. J Biol Chem 2001;276(16):12609-13.

23. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in E.coli. Microbiol Res 1996;60(3): 512-38.

24. Amersham Biosciences. GST gene fusion system handbook. edition AA, 2004;18:1157-58. available at: www4.amereshambiosiences.com.

25. Shibui T, Nagharia K. Secretion of a functional Fab fragment in E.coli and the influence of culture conditions. Appl Microbiol Biotech 1992;37(3):352-7.

26. Rodriguez P, Hernandez L, Munoz E, Castro A, Fuente JDL, Herrera L. Purification of streptokinase by affinity chromatography on immobilized acylated human plasminogen. Bio Techniques 1992;12(3):424-29.

۲۷. باباشمسی م، رضویان م ح، نژادمقدم م. تولید و خالص سازی استرپتوکیناز به روش کروماتوگرافی تمایلی حفاظت شده. مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، سال ۱۳۸۲، جلد۴، صفحات ۹۲-۸۹.

۲۸. معاونت غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. آمار سال ۱۳۷۸، لیست داروهای وارداتی.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]